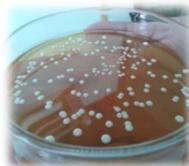


Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Departamento de Agronomía.

Trabajo de diploma

Título: Viabilidad de cepas de *Lactobacillus spp* en alimentos artificiales de las abejas.



Autora: Leidys Verano Luis.

Sancti Spíritus, 2017.



Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Agronomía

Trabajo de diploma

Título: Viabilidad de cepas de *Lactobacillus ssp* en alimentos artificiales de las abejas.

Autor: Leidys Verano Luis.

Tutor: Dr.C. Juan Emilio Hernández García.

Dr. M.V. Ken Jact Fernández León

Curso 2016– 2017

Año 58 de la Revolución

PENSAMIENTO:

“ Calidad es lo que tenemos que darle a nuestro pueblo; es una obligación nuestra, una obligación de cada uno como parte de nuestro deber hacia la comunidad”

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme su apoyo divino en cada etapa de mi vida académica, profesional y laboral para seguir adelante día a día, llegando a cumplir con cada objetivo trazado en mi vida.

A mis padres Leidys y Enrique, por su esfuerzo y dedicación que me brindaron en la buena formación de mi persona, por brindarme una carrera para mi futuro y por siempre creer en mí, y por su constante apoyo y consejo en las decisiones que tomé en mi vida personal y profesional.

A mi hermano Leiser por su constante apoyo y consideración, al igual que mis profesores y amistades muy cercanas por haberme apoyado de alguna manera en la culminación del presente trabajo de investigación.

Además a mi esposo Russell por todo su amor, cariño durante este tiempo,

Al Dr.C. Juan Emilio Hernández García, por haberme brindado su asesoría y haberme compartido sus conocimientos durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), que a través de sus laboratorios y personal técnico me permitieron realizar la esterilización y preparación de muestras para la ejecución de la investigación.

SÍNTESIS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), Sancti Spíritus; entre los meses de noviembre- abril 2017. El trabajo tuvo como objetivo determinar la viabilidad de cepas de *Lactobacillus ssp* en alimentos artificiales de las abejas (Jarabe-J). El diseño experimental incluyó 2 grupos problema y 1 testigo, representando cada grupo experimental concentración de sacarosa diferente, (J1 125 g de azúcar cruda /litro de agua y J2 50 % (v/v). Inicialmente se determinó el crecimiento y producción de gas de cepas de *Lactobacillus spp* aisladas de intestino de abejas en medio de cultivo base sacarosa (MBS), incubando las cepas a 37 °C durante 24 h. La viabilidad en el jarabe de las cepas seleccionadas *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73 fue determinada mediante el método de las diluciones con recuento en placa de unidades formadoras de colonias por mililitro de jarabe (UFC/mL). Se obtuvo como resultado que de las cinco cepas evaluadas ninguna produjo gas en Medio Base Sacarosa y tuvo abundante crecimiento el 60 % de las mismas. *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73 fueron capaces de mantener entre 6 y 7 Log₁₀UFC/mL a los 7 días. *Lactobacillus kunkeei* SS70 mantuvo crecimiento hasta los 21 días, al menos en uno de los jarabes (J1). Se concluye que las Bacterias Acido Lácticas (BAL) crecen en Medio Base Sacarosa (MBS) sin producción de gas y *Lactobacillus kunkeei* SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73 mantienen viabilidad en los jarabes ensayados hasta los 7 días.

SYNTHESIS

The present research took place at the Beekeeping Health and Investigations Reference Laboratory (BHIRL), in Sancti Spiritus; from November to April-2017. The objective of the present work is to determine the feasibility of the *Lactobacillus* ssp stump in the bees' artificial food (J- syrup). The experimental design included two problem groups and a control one. Each experimental group represented different concentration of sucrose (J1 125g of crude sugar/ a liter of water and J2 50% (v/v)). Initially, was determined the growth and productions of gas from the *Lactobacillus* ssp stump which were isolated from bees intestine in an environment of culturing sucrose base (MBS), incubating the stumps at 37 °C for 24 hours. The viability at the syrup of the chosen stumps (*Lactobacillus Kunkeei* SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73) was determined by the dilution method with recount at the plaque of former units of colonies for milliliter of syrup (UFC/mL). It was obtained as a result that from the five evaluated stumps none of them produced gas at environment sucrose base and had abundant growth the 60% of them. *Lactobacillus kunkeei* SS70 and *Lactobacillus rhamnosus* SS73 were able to keep between 6 and 7 Log₁₀UFC/mL at 7 days. *Lactobacillus kunkeei* SS70 keeps the growth until 21 days, at least at one of the syrups (J1). It is concluded that the BAL grows at environment sucrose base (MBS) without gas production and *Lactobacillus kunkeei* SS70 and *Lactobacillus rhamnosus* SS73 keep viability at the tested syrup up to 7 days.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1. Apicultura. Definición.	4
1.1.1 La apicultura en el contexto agrícola y pecuario mundial.	4
1.1.2. La Apicultura en el contexto agrícola y pecuario cubano.....	6
1.1.3 La apicultura. Relación con la seguridad alimentaria.....	6
1.2 Las Abejas (<i>Apis mellifera</i>).	7
1.2.1 Origen.....	7
1.2.2 Clasificación de las abejas melífera.....	8
1.2.3 Anatomía de las abejas	9
1.2.4. Las abejas como agentes polinizadores.....	10
1.2.5 Patógenos que afectan a las abejas melíferas en Cuba.....	13
1.2.6 Inmunidad de las abejas.....	14
1.2.7 Géneros predominantes de la microbiota del tracto gastrointestinal de las abejas melíferas.....	15
1.3 Probiótico.....	17
1.3.1 Evolución y definición del término probiótico.	17
1.3.2 Trabajo con Probióticos.....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1 Ubicación del experimento.....	21
2.2. Diseño Experimental.....	21
2.3. Métodos y técnicas de la investigación.....	21
2.3.1 Cepas	21
2.3.2 Preparación del Medio <i>Man Rogosa Sharpe</i> (MRS).....	22
2.3.3 Preparación del inóculo:	22
2.3.4 Capacidad de crecimiento de las cepas en medio de cultivo base sacarosa.....	23

2.4 Crecimiento de las cepas en alimento artificial (jarabe).....	23
2.4.1 Preparación del jarabe.....	23
2.4.2 Inoculación del Jarabe:.....	24
2.4.3 Viabilidad de las cepas seleccionadas en el alimento artificial (jarabe).24	
2.4.4 Recuento en Placa (RP).....	24
2.5 Análisis de datos.....	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1 Crecimiento y producción de gas de las BAL en el Medio Base con Sacarosa.....	26
3.2 Viabilidad y porcentaje de crecimiento en el <i>L. rhamnosus</i> (73) en jarabes de sacarosa	27
3.3 Viabilidad y porcentaje de crecimiento en el <i>L. kunkeei</i> (73) en jarabes de sacarosa	28
4. CONCLUSIONES	32
5. RECOMENDACIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA	
7. ANEXOS.....	

INTRODUCCIÓN

Las abejas, *Apis mellifera*, es uno de los más importante insectos en el ecosistema terrestre, no solamente por la producción de miel, dadas sus virtudes nutritivas y terapéuticas, sino además por su papel esencial como polinizadores de diferentes especies de plantas entomófilas (Kremen *et al.*, 2007; Demedio *et al.*, 2011). De las abejas depende la supervivencia y evolución de más del 80 % de las especies vegetales del planeta con peso económico importante en muchos países (Morse y Calderone, 2000; Verde, 2014).

La salud de las abejas depende fundamentalmente del balance de la microbiota del tracto intestinal y esta la conforman familias de bacterias Gram-negativas tales como: *Enterobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* y *Pseudomonadaceae*, en menor número gérmenes Gram-positivo, levaduras y otros mohos (Ptaszyńska *et al.*, 2016_a). Dentro de las bacterias del Género *Lactobacillus* (LAB) más importantes de la simbiota intestinal aislada de las abejas se encuentran: *Lactobacillus kunkeei*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. fermentum*, *L. floricola*, *L. acidophilus* y *L. johnsonii*.

Actualmente las colonias de la abeja son amenazadas por numerosos agentes patógenos, incluyendo virus, hongos, bacterias, y protozoos. La Loque americana, *Nosema ssp* y la *Varroa ssp* constituyen los patógenos más importantes de esta especie y aún constituyen los principales peligros de salud en la apicultura (Genersch *et al.*, 2006; Rosenkranz *et al.*, 2010; Evans y Schwarz., 2011; Higes *et al.*, 2013).

La Loque americana es una enfermedad cosmopolita que afecta a larvas de abejas (*Apis mellifera*). El organismo causante es la bacteria esporulada *Paenibacillus larvae* (Audisio *et al.*, 2011). Los signos de la enfermedad en campo se manifiestan por la presencia de cría salteada, opérculos hundidos húmedos y oscuros.

Para controlar o minimizar el efecto de esos patógenos frecuentemente las estrategias incluyen el uso de antibióticos y pesticidas que no solamente puede generar la resistencia de los patógenos, sino que además crea un desbalance de la microbiota normal de la abeja (Miyagi *et al.*, 2000; Evans, 2003).

Estos factores más tarde afectan la salud del insecto alterando la orientación y consecuentemente reduciendo el número de miembros de las colmenas (Barnett *et al.*, 2007).

Además, el uso de antibióticos y productos químicos aumentan o incrementan el riesgo de contaminación de los productos de las colmenas porque ellos pueden persistir en la miel y como consecuencia afectar su calidad con repercusión en la salud del consumidor (Martel *et al.*, 2006). Situación que pone en riesgo la comercialización del producto en el mercado interno y externo.

Una alternativa ante esa problemática es el uso de microorganismos probióticos en la profilaxis y terapia de diversas enfermedades de los animales y el hombre (Nava *et al.*, 2004). Los probióticos son definidos como “microorganismos vivos que cuando son administrados en forma adecuada al huésped producen efectos benéficos sobre su salud” (FAO, 2006).

Las bacterias del género *Lactobacillus* y las levaduras han sido las más estudiadas con esos fines. Muchas de estas especies son habitantes importantes del tracto intestinal del hombre y los animales.

Dentro de las fortalezas del sector apícola cubano, vinculadas con la seguridad y la soberanía alimentaria nacional, resalta el manejo integrado para el control de las enfermedades donde se propone el control de las enfermedades transmisibles sin el uso de medicamentos. Esto ayuda a obtener producciones inocuas. No obstante, es bien conocido el enorme riesgo a que se expone la cría apícola sin el uso de esos fármacos. Una alternativa acompañante a esa política puede ser la manipulación de la microbiota del tracto digestivo mediante la administración de probióticos para así promover la salud intestinal del insecto, a través de una mayor diversidad microbiana, la estabilidad de la misma, sus metabolitos y sus interacciones con el epitelio y el sistema inmune.

Más que en un enfoque terapéutico, este tipo de aditivos puede encontrar su principal aplicación en la prevención o profilaxis de infecciones ya que su acción, al contrario de los antibióticos, no se centra tan sólo en atacar directamente a agentes patógenos, sino en modular el medio ambiente gastrointestinal y, de esta manera, reducir el riesgo de enfermedades en sinergia con el sistema defensivo

del insecto huésped.

Existen varios investigadores que en los últimos años vienen trabajando con el uso de probióticos en abejas, no obstante los estudios aún son contradictorios en algunos casos e insuficientes en otros.

En Cuba no se dispone de estudios previos sobre el posible uso de probióticos en la salud y producción apícola, no basta con tener cepas aisladas de intestino de las abejas si estas no son capaces de sobrevivir en alimentos artificiales utilizados en su consumo.

Problema científico.

¿Mantienen la viabilidad las cepas de *Lactobacillus ssp* en alimentos artificiales de las abejas (Jarabe)?

Hipótesis:

Los *Lactobacillus ssp* aislados del estómago e intestino de abejas sanas son capaces de mantener su viabilidad en alimento artificial de las abejas y así poder utilizarse como probióticos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la viabilidad de cepas de *Lactobacillus ssp* en alimentos artificiales de las abejas (Jarabe).

OBJETIVO ESPECIFICO:

Determinar el crecimiento de cepas de *Lactobacillus spp* aisladas de intestino de abejas en medio de cultivo a base sacarosa (MBS).

Evaluar la viabilidad de cepas de *Lactobacillus* seleccionada en el alimento artificial (jarabe).

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1. Apicultura. Definición.

La apicultura es una actividad dedicada a la crianza de las abejas y a prestarles los cuidados necesarios con el objeto de obtener y consumir los productos que son capaces de elaborar y recolectar. El principal producto que se obtiene de esta actividad es la miel

Etimológicamente apicultura proviene de los términos del latín *Apis* (abeja), cultura (cultivo), según la Real Academia de la Lengua Española se define como el arte de criar abejas para aprovechar sus productos.

Para Pierre Jean-Prost, ingeniero agrónomo y apasionado por la apicultura, la apicultura es la ciencia de la cría y mantenimiento de las abejas con vista a obtener de su trabajo dirigido a la producción de miel, cera, polen y jalea real como principales productos del colmenar.

A todo ello se suma el beneficio producido por la actividad apícola en la agricultura y diversidad vegetal, producto de la función polinizadora que realizan estos insectos sobre las plantas cultivadas y silvestres, mientras realizan las labores de pecoreo o búsqueda de alimento.

1.1.1 La apicultura en el contexto agrícola y pecuario mundial.

Hasta mediados del siglo XVIII, en la mayoría de los países se practicaba una agricultura de subsistencia, hecho que cambió a partir del siglo pasado, bajo la presión del desarrollo demográfico y el aumento de la demanda de alimentos. Esto obligó a rediseñar (sobre todo en los países desarrollados) los sistemas productivos agrícolas y agropecuarios por otros modernos e intensivos y a incorporar nuevas áreas agrícolas, muchas de ellas con cultivos incluso transgénicos o monocultivos no melíferos en grandes extensiones de terreno para producir biocombustibles o alimentos. Todos estos son dependientes de plaguicidas que, por paradoja, también en el caso de los cultivos entomófilos, dependen de las abejas como agentes polinizadores (Yangari ,2008).

Estos ecosistemas productivos, agrícolas o agropecuarios, tienen marcadas diferencias que repercuten en la disponibilidad de los alimentos para las familias de abejas y en el modo de practicar la apicultura. A su vez, los cambios en la demanda de alimentos, modifican los sistemas productivos apícolas por otros modernos e intensivos que dan respuesta a los nuevos contextos, como parte del entramado de relaciones que se establecen entre los sistemas agrícolas y agropecuarios, y que hacen del hombre el principal intermediario entre el animal y el ecosistema donde se inserta y produce.

La apicultura mundial trabaja hoy en ecosistemas que, en su mayoría, se encuentran deteriorados por causas antrópicas. Se incluye aquí el impacto drástico que provocan las guerras, la pérdida de flora melífera por la tala o poda indiscriminada, la urbanización, los desplazamientos de asentamientos humanos hacia áreas que fueron antes de flora silvestre entomófila, los cultivos abundantes en flora melífera, los bosques nativos profusos en vegetación arbórea y sotobosques melíferos, así como la introducción de especies invasoras, las contaminaciones ambientales o la fragmentación de los hábitats naturales.

En el caso de los ecosistemas agrícolas, el intenso laboreo de la tierra tiende a reducir, y hasta destruye los nichos naturales de insectos polinizadores. De esta forma, la agricultura intensiva se desarrolla según modelos cada día más dependientes de la apicultura moderna e intensiva (casi siempre trashumante) con abejas melíferas, sometida a presiones y modificaciones antrópicas complejas o al límite con su existencia, que la conducen a un equilibrio precario, de no ser racional y eficaz la intervención del hombre como mediador entre las colonias de abejas y los ecosistemas productivos, donde estos insectos siguen siendo protagonistas como polinizadores. (Natalichio, 2008).

No se debe desestimar el efecto de la agricultura intensiva en la biodiversidad, donde resulta baja la conservación de los nutrientes por la lixiviación del terreno y la exportación de las cosechas que se llevan en sí el aporte de estos componentes y el agua. Este tema es poco estudiado en lo que respecta al efecto de este tipo de agricultura en la nutrición y el equilibrio de las abejas insertas en estos agroecosistemas (Verde y Chan, 2005; Verde, 2014).

1.1.2. La Apicultura en el contexto agrícola y pecuario cubano

En Cuba la apicultura está incluida como una rama agropecuaria de interés para el Ministerio de la Agricultura y se contempla entre las estrategias de desarrollo agropecuario, respaldada por políticas que propician la cohesión del sector. Se contribuye así a la integración de este con otras esferas de la sociedad: universidades, escuelas técnicas, centros de investigación y ministerios, entre otro.

De igual forma el manejo integrado para el control de las enfermedades incluye el control de las enfermedades transmisibles sin el uso de medicamentos, ayudando así a obtener producciones inocuas (MINAG, Resolución 547/2013).

La apicultura en Cuba es considerada como una actividad importante, por constituir un recurso productivo exportable y una forma de vida que permite la conservación de la diversidad biológica, su explotación está enfocada hacia un sistema empresarial moderno, trashumante e intensivo. El sistema de atención a la especie tiene como meta alcanzar el incremento sostenido de “producciones limpias” y de calidad inobjetable, lo que sólo es posible lograr con buenas prácticas zootécnicas y sanitarias en cada punto de la cadena productiva, para mantener colmenas sanas y en equilibrio con el medio donde se desarrollan (Verde y Chan, 2005; Verde, 2014). Solo con esas premisas se mantiene la calidad exportable, según los requisitos exigidos por los miembros de la Unión Europea, convertidos en los mayores compradores de la miel de la Isla.

1.1.3 La apicultura. Relación con la seguridad alimentaria

El acceso físico, social y económico de todas las personas, y en todo momento, a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias en cuanto a los alimentos, a fin de llevar una vida activa y sana, son los rasgos que definen la seguridad alimentaria. Se habla también de este concepto cuando se aseguran alimentos sanos al alcance de todos (Martín y AA.VV, 2009).

En el caso de la apicultura, su vínculo con la seguridad alimentaria debe abordarse desde diversas perspectivas: como elemento biológico indispensable para asegurar con la polinización, la calidad y los rendimientos de los cultivos

entomófilos; por su impacto en la biodiversidad y el equilibrio hídrico, que a su vez garantiza y favorece los cultivos de los alimentos que participan en la cadena trófica del hombre, y por las producciones de alimentos que genera con la necesaria inocuidad que deben tener para el consumo de forma directa por el hombre.

La inocuidad de los alimentos que se consumen es una condición inherente al concepto de seguridad alimentaria. Los productos de la colmena tienen que cumplir los parámetros que se establecen para este fin. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha señalado reiteradamente que las enfermedades de origen alimentario, como las tox infecciones alimentarias (TIA) o las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) figuran entre los problemas más acuciantes de los sistemas de salud pública (Martín y AA.VV, 2009).

Por ello, se han establecido normas internacionales que la industria apícola precisa cumplir para la producción y el comercio de los alimentos.

Corresponde a los servicios veterinarios de un país el establecimiento de controles sanitarios en toda la cadena productiva, que permitan velar por la ausencia de residuos químicos, sustancias prohibidas, contaminaciones microbiológicas o partículas groseras en los productos de la colmena (Verde *et al.*, 2012).

1.2 Las Abejas (*Apis mellifera*).

1.2.1 Origen

La abeja doméstica o abeja melífera (*Apis mellifera* L.) descrita por Linneo en 1758, pertenece a la familia Apidae incluida en el orden Hymenoptera, y es la especie de abeja con mayor distribución a nivel mundial.

Las abejas se encuentran íntimamente ligadas a la evolución del hombre como ser social. Presentes en la tierra hace más 60 millones de años, el desarrollo evolutivo del insecto, mantuvo estrecha dependencia con el de las plantas con flores, frutos y semillas. Existen evidencias fósiles de las abejas muy anteriores a las del hombre. De esta relación planta – insecto, surge la importancia ecológica y económica que hoy se atribuye a la abejas. (Verde *et al.*, 2013).

Apis mellifera o abeja melífera, es un insecto social con actividades o funciones que están condicionadas por la época del año y las edades de los individuos hembras y machos que la integran y forman las castas. Cada colonia tiene dos castas femeninas: una reina y 25 000 a 80 000 obreras y una casta masculina, zángano que llegan a cientos, cuando la colonia está en fase de multiplicación. (Sanidad apícola, colectivo de autores, 2002).

Como características de los insectos sociales, las colonias de abejas melíferas poseen división del trabajo: las obreras jóvenes alimentan y atienden a la reina y las crías, las obreras más viejas se encargan de coleccionar polen, néctar, propóleos, agua y defienden a la colonia de posibles invasores. Las abejas obreras adultas regulan la temperatura y la humedad del nido (homeostasis) asegurando valores prácticamente constantes, aun cuando varíen las condiciones ambientales externas. Cualquier variación de estas conductas, denota pérdida de bienestar o conducen al deterioro de la salud. (Sanidad apícola, colectivo de autores, 2002)

1.2.2 Clasificación de las abejas melífera.

Reino:	<i>Animalia</i>
Filo:	<i>Arthropoda</i>
Clase:	<i>Insecta</i>
Orden:	<i>Hymenoptera</i>
Suborden:	<i>Apocrita</i>
Superfamilia:	<i>Apoidea</i>
Familia:	<i>Apidae</i>
Subfamilia:	<i>Apinae</i>
Tribu:	<i>Apini</i>
Género:	<i>Apis</i>
Especie:	<i>A. mellifera</i> LINNAEUS, 1758

1.2.3 Anatomía de las abejas

Las abejas, como todos los insectos, poseen un cuerpo dividido en 3 partes: cabeza (contiene órganos sensoriales), tórax (posee órganos locomoción) y abdomen (tiene órganos digestivos y de la reproducción). Poseen un exoesqueleto constituido por quitina. Una colonia de abejas está integrada por 3 tipos de individuos:

- Abeja reina: posee el cuerpo más largo y ancho que las obreras, la cabeza es ligeramente cuadrada y, el abdomen es alargado y de forma cónica. Sus alas, cuando están plegadas, no alcanzan a cubrir el último tercio del abdomen. Pesa de 200 a 250 mg. La esperanza de vida de la reina es de tres o cuatro años, alcanzando su capacidad reproductora máxima alrededor de los dos años. Periódicamente y de forma natural será sustituida por una reina más joven con mayor capacidad reproductora y capaz de secretar una cantidad suficiente de feromonas reales que regulen el comportamiento de todas las abejas de la colonia.

- Zángano: Los zánganos son individuos de mayor tamaño que las obreras y proceden de huevos sin fecundar (haploides). Su misión principal es fecundar a las reinas vírgenes durante el vuelo nupcial, pero también colaboran en la termorregulación de la colmena. Posee una cabeza casi esférica, por la disposición de sus ojos compuestos. El tórax es fuerte y de mayor diámetro que el de las obreras y reinas; el abdomen es ancho, con la porción terminal ligeramente redondeada. Pesa de 180-200 mg. (Pesante, 2010.) Los zánganos no son capaces de succionar el néctar y, por ello, mueren de hambre y frío. Como los machos no recolectan néctar ni polen, cuando escasea el néctar, son eliminados en cualquier época del año.

- Obreras: son de menor tamaño que los anteriores. La cabeza es triangular, por el menor desarrollo de los ojos compuestos. Sus alas, a diferencia de la reina, cubren totalmente el abdomen cuando están plegadas. Pesa de 100-130 mg. La esperanza de vida de las obreras varía en función de la época del año en la que ocurra su nacimiento, según los esfuerzos que realice durante su edad adulta. De modo que las abejas que nacen durante la primavera tienen una vida útil entre 25-35 días y, por el contrario, las que se crían a finales de verano o principios de

otoño, pueden llegar a vivir entre seis y ocho meses (Maurizio, 1950). La última fase de la vida de las obreras consiste en la búsqueda y recolección del alimento o también llamada pecorea.

1.2.4. Las abejas como agentes polinizadores.

La polinización es un proceso que permite mantener la vida vegetal en el planeta, en donde las plantas producen semillas y frutos por medio del intercambio de polen entre las flores. Uno de los tipos de polinización es la polinización entomófila, en donde insectos polinizadores trasladan el polen desde las anteras (parte masculina de una flor) hasta los estigmas (parte femenina), ya sea de la misma planta o de otras que se encuentren en los alrededores (Bradbear, 2005).

Las abejas melíferas (*Apis mellifera L.*) desempeñan una función protagónica por su actividad polinizadora insustituible, ante una agricultura cada vez más moderna e intensiva. El hombre no puede manejar con estos fines mariposas, coleópteros, murciélagos o pájaros. Son las abejas, populosas y dependientes de las plantas, las que se ocupan de polinizar infinidad de cultivos que forman parte de la cadena trófica del hombre (Verde *et al.*, 2013).

Ecosistemas y abejas. La Ley 165 para el Convenio de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica (ONU 1994), en su artículo 2, define el término ecosistema como un complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y de microorganismos y su medio no viviente que interactúan como una unidad funcional. De hecho, la unidad funcional en la apicultura es la colmena.

La colmena está formada por un conjunto de individuos (las abejas) y los elementos orgánicos e inorgánicos que, a manera de un complejo dinámico, a su vez, interactúa con las comunidades de elementos vegetales, animales y su medio no viviente (Verde, 2010).

Un ecosistema es un conjunto de organismos vivos, mutuamente acoplados, que ocupan un área como unidad reconocible en comunidad biológica con el ambiente físico-químico en que se desarrollan (biotopo), integrados ambos en una unidad estructural y funcionalmente definida, cuyos componentes mantienen no representa nada, es efímera y sin futuro. La colonia como un todo, es la unidad

biológica funcional que se relaciona y forma parte indisoluble de los ecosistemas donde habita. Está marcada por la conducta gregaria de esta especie.

La evolución de la clase Insecta y del orden Hymenoptera, donde figuran las abejas que habitan en los cultivos, bosques y jardines, ocurrió en el período Jurásico, hace aproximadamente 180 millones de años, como resultado de la coevolución de las plantas con flores, las que, al tener ovarios y estigmas (fanerógamas y angiospermas), dependían de los insectos para poder realizar su reproducción (polinización entomófila), hecho que a su vez determinó la evolución de la familia Apidae y del género *Apis* en el período del Eoceno de la era Cenozoica o Terciaria, razones que se han documentado de manera irrefutable a partir de hallazgos fósiles (Carpana, 2004).

De las tres subfamilias que conformaron la familia Apidae (Meliponinae, Bombinae y Apinae), logró alcanzar mejores adaptaciones la Apinae, lo que permitió que fuesen más cosmopolitas. El género *Apis* consiguió mayor distribución en el mundo, con ecotipos de clima tropical y templado y una amplia diversidad de subespecies. Este hecho conllevó al establecimiento de distintas razas de abejas, como *Apis mellifera* o abeja negra alemana y *Apis mellifera ligustica* o abeja italiana, presentes en el genofondo de la abeja criolla cubana (ACPA, 2010).

Las abejas africanas, que se trabajaban en regiones del África, solo adquirieron interés económico y social cuando se introdujeron por el hombre en América y se cruzan con las razas locales, lo que originó un híbrido que se expandió por todo el continente.

Todas presentan características anatómicas, fisiológicas y conductuales que las hacen dependientes de las plantas: necesitan del polen y del néctar para alimentarse, reproducirse y mantener sus crías. Precisan de las resinas (propóleos) para impermeabilizar y proteger sanitariamente a la colonia. Son como “mecanismos perfectos”, diseñados por la naturaleza para la polinización (ACPA, 2010).

El hombre apareció mucho después que la abeja. La abeja no cambió, solo realizó adaptaciones a los diversos hábitats y modificó sus respuestas conductuales, como opción adaptativa ante los disímiles cambios que el hombre

fue imponiendo al insecto para cubrir sus necesidades productivas o por la transformación que hizo y hace de los ecosistemas y escenarios productivos.

La evolución de los insectos, las plantas entomófilas y las abejas se estima, aproximadamente, en 50 millones de años. Los homínidos, es decir, la familia a la que pertenece la especie humana (*Homo sapiens*), ha dejado evidencias fósiles que no van más allá de los 600 000 años. El hombre reconoció a la abeja y con ella, la miel como alimento dulce, mucho después que esta hubiera asumido la importante función de la polinización, principal contribución del insecto como dinamizador de la diversidad biológica y del equilibrio de los ecosistemas. (Carpana, 2004)

Las abejas aseguran 65 % de la reproducción de las plantas, representan 20 % de las 100 000 especies de insectos que se incluyen en la clase Insecta y el orden Hymenoptera. Dependen de las flores para subsistir, y muchas de las especies vegetales que para su reproducción y supervivencia dependen del género *Apis*, integran la cadena alimentaria del hombre (Carpana, 2004)

De las 100 especies de vegetales que proveen 90 % de los abastecimientos de alimento en 146 países, 71 son polinizadas por las abejas, mientras que 80 %

de las especies de plantas silvestres son fecundadas por insectos. Sin abejas no hay polinización. Sin polinización no hay semillas. Sin semillas no hay frutos ni rendimientos de los cultivos entomófilos ni alimentos suficientes para los animales y el hombre. Se rompería la cadena trófica, desaparecerían especies de plantas y animales, se afectaría el ciclo del agua y el hambre y la desertificación se adueñarían de nuestros campos (Yangari, 2008).

La polinización por abejas representa entre 73 y 88 % de la polinización entomógama (entomófila), mientras que a otros himenópteros (abejorros, abejas solitarias, entre otros) se les atribuye de 6 a 21 %. Al resto de los insectos solo corresponde entre 6 y 14 %. De las abejas depende la supervivencia y evolución de más del 80 % de las especies vegetales del planeta. Cada año, las abejas melíferas polinizan plantas y plantaciones con valor estimado en 40 billones de dólares, más de un tercio de la producción de alimentos en muchos países. En

Europa, 84% de la producción de las especies cultivadas dependen directamente de la polinización entomófila (APITRACK, 2008 y Noticias Api News, 2013).

En la agricultura, las abejas aseguran prácticamente la producción de todas las especies de frutales y cítricos (aguacate, mango, limón, naranja, mandarina) y las cucurbitáceas (calabaza, melón de Castilla, sandía o “melón de agua”, pepino, entre otros). También intervienen en las producciones de fresa, manzana, durazno, cereza, cebolla, tomate, pimiento, quimbombó, berenjena, habichuela, frijoles, pera, kiwi, alfalfa, trébol, girasol, algodón, cártamo, soya, especies de palmas, mora blanca y ciruelos, cerezos, entre otros (Demedio *et al.*, 2011).

1.2.5 Patógenos que afectan a las abejas melíferas en Cuba.

El estado sanitario de las colmenas es tanto más satisfactorio cuando mejor se adaptan a los factores ecológicos. La adaptación incompleta se manifiesta por la disminución del rendimiento y por la predisposición a las enfermedades. Uno de los factores que interviene en el desencadenamiento de las enfermedades apícola es la escasez de alimentos cuando la floración disminuye, siendo necesario realizar traslados de colmenas a las zonas costeras y/o suministrar alimentos a las abejas. Este cambio para la familia de abejas es un factor importante para el surgimiento de las enfermedades. Otro aspecto del problema ecológico se refiere a la productividad del medio y sus relaciones con el ciclo biológico de las abejas. La producción es cíclica y muy variable de un lugar a otro, no es ilimitada, todo lo que actúa sobre la producción lo hace también sobre las abejas.

De acuerdo a los reportes de Verde et al., 2013), las principales enfermedades involucradas en la salud apícola en Cuba son:

- *Loque americana (Paenibacillus larvae)*
- *Loque europea (Paenibacillus alvei)*
- *Nosemosis Nosema apis*
- *Varroosis Varroa destructor*
- *Acarapisosis*

1.2.6 Inmunidad de las abejas.

La división del sistema inmune de los insectos en humoral y celular la podemos considerar como clásica. Los humores son líquidos y obviamente la hemolinfa es un líquido que funciona como un sistema de transporte de diferentes compuestos (moléculas), en el que también podemos encontrar varios tipos celulares que se denominan hemocitos (Padilla *et al.*; 2009).

La base del sistema inmune de las abejas se encuentra en la información almacenada en los genes, por lo tanto para hablar de este tema tenemos que ir a un nivel genómico y estudiar diferentes genes para conocer cómo se expresan (Evans *et al.*; 2006, Wilson-Rich *et al.*; 2008). Recientemente se ha identificado un gen en abejas que tiene un papel preponderante en la codificación de la respuesta ante patógenos.

En la hemolinfa de las abejas viajan diferentes moléculas y compuestos que pueden atacar a los agentes patógenos y que reciben el nombre de respuesta humoral. Dicha respuesta humoral está formada por los siguientes sistemas: (1) péptidos y proteínas antimicrobiales, (2) sistema de la fenoloxidasa, (3) cascadas enzimáticas que regulan la mecanización y coagulación de la hemolinfa y (4) producción de reactivos intermedios de oxígeno y nitrógeno (Lavine y Strand, 2002).

De igual forma se describe en las abejas una inmunidad social, conocido como desparasitación o “grooming”, el mismo consiste en la retirada de objetos o patógenos de sí mismo o de un compañero (Padilla *et al.*, 2009).

Comunidad microbiana intestinal de la abeja melífera y su rol en la salud de la colmena.

En las abejas el intestino constituye el primer lugar donde se verifica el proceso de digestión del alimento, así como el sitio donde pueden instaurarse una serie de patógenos, incluyendo el *Paenibacillus larvae* (Graaf *et al.*, 2013), *Ascosphaera apis* (Jensen *et al.*, 2013) *Nosema ceranae* (Fries *et al.*, 2013), y probablemente muchas otras enfermedades virales (Miranda *et al.*, 2013).

Los estudios sobre la biología de los microorganismos del tracto intestinal se han incrementado progresivamente, reconociendo su papel benéfico en muchos aspectos de la salud de los animales, animales tan diversos como mamíferos e insectos. El papel de microbios simbióticos del intestino en la digestión, la resistencia a enfermedad contagiosa, y la salud en general de las abejas melíferas puede verse expresada tanto en lo individual como a nivel de toda la colonia, es un área en la que aún se necesita seguir investigando para su esclarecimiento (Engel,2013).

Las abejas melíferas poseen una alta especificidad de la comunidad microbiota intestinal, componiéndose por alrededor de 8 filotipos específicos de microorganismos que no provienen desde el alimento (Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012).

Dado la dificultad de discernir entre especies en lo que se refiere a bacterias, cada “grupo” puede representar actualmente uno o más especies. No obstante, estos grupos son válidos ya que consisten en clones filogenéticos bien definidos, y las bacterias dentro de cada clones son encontrados en colaboración con abejas y no con otros animales o fuentes medioambientales (Martinson *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2012; McFrederick *et al.*, 2012).

Las bacterias de cada uno de estos grupos pueden ser cultivadas en los medios microbiológicos estándares y bajo condiciones correctas de crecimiento. Recientes estudios sobre aislamientos han corroborado los reportes que sustentan el predominio de una microbiota mayoritaria (Olofsson y Vásquez, 2008; Engel *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2012; Vásquez *et al.*, 2012; Kwong y Moran, 2013). Mediante la combinación de cultivos de bajo crecimiento- el análisis de comunidades independientes de bacterias y la fortaleza de las técnicas moleculares disponibles se pueden llegar a un riguroso estudio de la microbiota de las abejas y sus asociaciones.

1.2.7 Géneros predominantes de la microbiota del tracto gastrointestinal de las abejas melíferas.

Género *Snodgrassella*. Crecen en presencia de CO₂ (5%), a temperatura entre 35-37 °C, pudiéndose cultivar en Triptona Soya Agar y Agar Infusión de Corazón

(Kwong y Moran, 2013). Forman colonias aisladas blanquecinas, diámetro de 1mm. en. Son Gram positivos en forma de barra y poco móviles

Género *Gilliamella*. Tienen condiciones óptimas de crecimiento iguales al Género *Snodgrassella*, las colonias redondas blancas, 2,5 mm de diámetro. Son Gram positivos en forma de barra y no móviles, puede formar cadenas de filamento. Es negativa para catalasa, reducción de nitrato y oxidasa (Kwong y Moran, 2013).

Género *Frischella*. Crecen en presencia de CO₂ (5%) o anaerobiosis, a temperatura entre 35-37 °C, en los mismos medios que los géneros anteriores. Es anaerobia facultativa, pero no crece en condiciones completamente aeróbicas (Engel *et al.*, 2013). Forma colonias planas, semitransparentes de 1mm diámetro. Las células son en forma de barra y pueden formar filamentos o cadenas. *Frischella* puede obtener carbón a través de la fermentación de glucosa, fructosa, y manosa. Son Gram negativo, catalasa positiva y negativa para la reducción de nitrato y oxidasa. (Engel *et al.*, 2013).

Género *Bifidobacterium*. Crecen en atmosferas aeróbica o anaeróbica e temperatura de 37 °C. Pudiendo cultivarse en Agar Sangre y medio MRS (Bottacini *et al.*, 2012). *Bifidobacterium* es típicamente anaerobio o microaerófilico; sin embargo, cepas aisladas del intestino de la abeja han mostrado crecimiento en aerobiosis (Bottacini *et al.*, 2012). *Bifidobacterium* de intestino de abejas es catalasa negativa, no forman esporas, son Gram positivos y producen ácido láctico y acético (Olofsson y Vásquez, 2008).

Género *Lactobacillus*. Las células del género *Lactobacillus* puede variar desde largos y delgado bacilos a cortos coco bacilos. (Hammes y Hertel, 2009). Las morfologías de la colonia también varían, pero son típicamente convexas, lisas, opaco y sin pigmento (Hammes y Hertel, 2009). Los *Lactobacillus* asociados con las abejas son Gram positivos, catalasa negativo, no esporulado y producen ácido láctico por homofermentación (Olofsson y Vásquez, 2008). El *Lactobacillus kunkeei* SS70 Clade es fructofílico, utilizando preferentemente fructosa sobre glucosa como fuente de carbón (Neveling *et al.*, 2012).

Las especies de *Lactobacillus* son ubicuas en la naturaleza y son comúnmente encontradas en asociación con muchos animales, plantas y productos alimenticios.

Los *Lactobacillus* son ampliamente considerado como probiótico, a partir de que su presencia es beneficiosa para la salud del organismo huésped (Kleerebezem y Vaughan, 2009). Los *Lactobacillus* asociada a las abejas se incluyen en dos clases principales, “Firm-4” y “Firm-5” (Babriendier *et al.*, 2007; Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012). Estos clades son sólo parientes lejanos de otro *Lactobacillus*, con identidades de 16S rRNA ~ 90 % (Olofsson y Vásquez, 2008; Vásquez *et al.*, 2012), y así eventualmente pueden ser clasificado como especies nuevas.

Otras especies, *L. kunkeei* SS70, pueden ser la cepa de *Lactobacillus* más frecuentemente recuperada en experimentos de aislamientos o cultivos (Tajabadi *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2012; Neveling *et al.*, 2012). Sin embargo, estudios de cultivos independientes muestran que “Firm-4” y “Firm-5” son los *lactobacillus* dominantes en el intestino de la abeja, no *L. kunkeei* SS70 (Moran *et al.*, 2012; Ahn *et al.*, 2012). *L. kunkeei* SS70 también ha sido encontrada en flores (Neveling *et al.*, 2012) y el vino (Edwards *et al.*, 1998), sugiriendo que pueden tener otro hábitat natural fuera del intestino de la abeja (McFrederick *et al.*, 2012). *Lactobacillus* es el grupo más abundante en el intestino de la abeja y se ha estimado que comprende de 20-99 % de bacterias en las obreras individuales (Moran *et al.*, 2012).

1.3 Probiótico

1.3.1 Evolución y definición del término probiótico.

El científico Elie Metchnikoff en el año 1907, evidenció beneficios en el proceso de fermentación de la leche, tras notar que los lactobacilos convertían la lactosa en ácido láctico, por ende la acidez generada creaba un ambiente hostil para las bacterias patógenas. De esta manera, defendió la importancia de la dieta en la salud, tras proveer protección frente a patógenos y así mejorar la calidad de vida. (Fooks *et al.*, 2002)

El médico pediatra francés Henry Tissier, destacó la importancia de las bifidobacterias, al notar la baja cantidad en niños con episodios diarreicos, no así en niños sanos, en quienes encontraba una cantidad significativa, con esta investigación postuló que la administración de bifidobacterias a pacientes con diarrea podría ayudar a restaurar su flora intestinal. (Fooks *et al.*, 2002)

Lilly y Stilwell en 1965, introdujeron por primera vez el término “probiótico” refiriendo que son “Sustancias secretadas por un organismo y capaces de estimular el crecimiento de otro”. (Fooks *et al.*, 2002)

Parker en 1974 definió a los probióticos como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. (Fooks *et al.*, 2002)

Fuller en 1989 postuló a los probióticos como “suplementos microbianos que influyen beneficiosamente en el huésped animal mejorando su balance microbiano”. (Fooks *et al.*, 2002)

Salminen en 1998 posteriormente, conceptualizó a los probióticos como “Alimentos que contienen bacterias vivas las cuales son beneficiosas para la salud”. (Green *et al.*, 2009)

Con la consecuente investigación en torno al tema y teniendo en cuenta los postulados y las definiciones anteriormente enunciadas, se ha ampliado y actualizado el concepto que se tiene de probióticos, como un producto que contiene un número suficiente de microorganismos vivos, puros o mixtos, con un efecto beneficioso sobre la salud, a través de una alteración positiva de la microbiota por colonización del intestino.

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió los probióticos como Microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedador. (Rodríguez *et al.*, 2012)

1.3.2 Trabajo con Probióticos.

En esa línea de trabajo a nivel mundial se viene trabajando en la manipulación de la flora intestinal en diversas especies de animales y más recientemente también en las abejas.

La microbiota del tracto digestivo de las abejas es muy variada y está asociada al tipo de alimentación que tengan las colmenas, el sistema de explotación y la estacionalidad (Rousseau *et al.*; 1969; Gilliam y Morton, 1978; Gilliam y Prest, 1987; Mohr y Tebbe, 2006).

Las abejas melíferas poseen una alta especificidad de la comunidad microbiota intestinal, componiéndose por alrededor de 8 filotipos específicos de microorganismos que no provienen desde el alimento (Martinson *et al.*, 2011; Moran *et al.*, 2012).

La presencia de bacterias ácido lácticas (probióticos) en el tracto digestivo de las abejas melíferas y su vinculación con la salud y producción ha sido menos estudiada que en los animales mayores; resaltan su papel benéfico (Scardovi y Trovatielli, 1969; Rada *et al.* 1997; Gilliam, 1997; Jeyaprakash *et al.*; 2003; Kacaniova *et al.*; 2004 Babendreier *et al.*; 2007; Olofsson y Vásquez (2008), Pătruică y Mot 2012, Pătruică *et al* 2012)

Dentro de los mecanismos de acción más estudiados de los probióticos se mencionan la estimulación del sistema inmune, competencia por la adhesión, producción de sustancias antimicrobianas, y la neutralización de enterotoxinas y sustancias amínicas; acciones que sustentan los resultados benéficos alcanzados en el uso de probióticos en abejas (Vásquez *et al.*; 2008, Audisio *et al.*; 2011, Tajabadi *et al.*; 2013; Chahbar Nora y Mahamed, 2014). Otro de los mecanismos de acción de los probióticos, es su rol en la digestión y absorción de nutrientes (Intriago y Jones ,1993).

En Cuba el sistema de producción apícola se encamina a lograr buenas prácticas zootécnicas y sanitarias en cada punto de la cadena productiva, para mantener colmenas sanas y en equilibrio con el medio donde se desarrollan (Verde y Chan, 2005; Verde 2014), sin tener que recurrir al uso de productos químicos como los

antibióticos como regula el sistema de Control de Salud de Cuba (Resolución 547/2013).

El empleo de probiótico dentro de esta misma línea de trabajo como terapia no farmacológica para la prevención de algunas deficiencias sanitarias de origen microbiano permitiría mantener e incrementar la producción de alimentos de manera sustentable y agroecológica. Los indicadores higiénico-sanitarios se mejorarían en la colonia completa a partir diversos mecanismos de acción de los probióticos; los cuales funcionan como una barrera de defensa profiláctica contra los patógenas de este insecto (Audisio *et al.*; 2015).

El uso de probióticos en la salud y producción animal en Cuba se ha centrado en su mayoría en estudios sobre animales mayores y menores (bovinos, cerdos, aves, conejos); (Hernández *et al.*, 1998, Brizuela *et al.*, 2001, García *et al.*,2005, García *et al.*,2008, Rondón *et al.*,2008, Rodríguez *et al.*,2009; Ferreira *et al.*,2011; Sánchez *et al.*,2011a, Milián Grethel *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2014;Sánchez y Tromps 2014;Marin ,2010, García Yaneisy y García Yanelys, 2015,) y en menor medida en otras especies (Fonticiella ,2005; Sánchez *et al.*,2013), pero ninguno de ellos, ha estado vinculado al uso en abejas melíferas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Ubicación del experimento

La investigación se realizó en el Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA), Sancti Spíritus; perteneciente a la Unidad de Laboratorios Centrales de Sanidad Agropecuaria del MINAG, Cuba. Los ensayos se desarrollaron entre los meses de noviembre- abril 2017.

2.2. Diseño Experimental

Se trabajó un diseño experimental con 2 grupos problema y 1 testigo, representando cada grupo experimental condiciones de concentración de sacarosa diferente.

La variable independiente fue la concentración de sacarosa y la variable dependiente, el crecimiento de las cepas BAL en el Jarabe. El producto final se comparó con un patrón: jarabe sin inocular.

2.3. Métodos y técnicas de la investigación.

2.3.1 Cepas

Las cepas a utilizar en los ensayos pertenecían al banco de cepas de *Lactobacillus ssp* del Laboratorio de Referencia para Investigaciones y Salud Apícola (LARISA) y el Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad de Sancti Spíritus “José Martí Pérez”. Las cepas fueron aisladas previamente del intestino y estómago de abejas sanas.

2.3.2 Preparación del Medio *Man Rogosa Sharpe* (MRS).

Composición:

Reactivos	Cantidad
Pectona	10g/ L
Extracto de sustancia	5g/ L
Extracto de Levadura	5g/ L
D(+) Glucosa	20g/l
Hidrógeno de Potasio Fosfato	2g/l
Hidrogeno de Amonio y Citrato	2g/l
Acetato de Sodio	5g/l
Sulfato de Magnesio	0,01g/l
Sulfato de Manganeso	0,05g/l
Agar	12g/l
Final	pH 6.5 +/- 0,2 al 25·c

Indicaciones

Suspender 61,15 g en 1000 ml de agua destilada conteniendo 1 ml polysorbate 80 (TEEN® 80; Sigma P 8074). Hervir para disolver el medio completamente y mezclar rigurosamente esterilizado en la autoclave a una presión de 15 lb (121°C) por 15 minutos. Es necesario ajustar el PH con ácido acético antes de la esterilización.

2.3.3 Preparación del inóculo:

Los cultivos puros fueron inoculados en caldo MRS e incubados entre 18-20 h en condiciones de aerobiosis. La concentración final fue entre 1×10^7 UFC/mL y 1×10^8 UFC/mL.

2.3.4 Capacidad de crecimiento de las cepas en medio de cultivo base sacarosa.

Para comprobar el crecimiento de las BAL en el medio de cultivo base Sacarosa (MBS) se confeccionó el medio con la siguiente composición:

Reactivos	Cantidad
Peptona bacteriológica	10g
Tween 80	1,08 mL
Extracto de levadura	5g
Sacarosa	20g
Agua Destilada	1000 mL

Todos los componentes se diluyeron en agua destilada, se ajustó a pH 6.5 y fueron distribuidos en tubos de cultivos de 15 mL a razón de 9 mL por tubo, colocando en el interior de los mismos los tubos Durhans para determinar la producción de gas (la cantidad del medio en el tubo debe cubrir la altura del tubo Durhans). La esterilización fue a 121⁰C durante 15 min.

Una vez preparado el medio MBS se inoculó 0.1 mL de cada cultivo fresco. La incubación fue en condiciones de aerobiosis por 72 h.

Después de la incubación se comprobó el crecimiento de las cepas y la producción de gas. Se valoró las cepas de mejor comportamiento para los siguientes análisis:

2.4 Crecimiento de las cepas en alimento artificial (jarabe).

2.4.1 Preparación del jarabe.

El jarabe utilizado como alimentación artificial en las colmenas fue elaborado en dos variantes:

Jarabe 1. Una parte de azúcar cruda y una parte de agua (50% c/u).

Jarabe 2: Se tomaron 125 g de azúcar cruda /litro de agua (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011). En ambos casos fueron hervidas durante diez min,

descartándose el sobrenadante; luego de enfriarse se ajustó a pH 6 y dispensadas en tubos de ensayo bajo condiciones de esterilidad a razón de 9 mL.

2.4.2 Inoculación del Jarabe:

Para la inoculación a cada tubo de jarabe con 9,9 mL se le añadió 0,1mL del inóculo fresco. Las diferentes variantes de jarabe y el grupo control se mantuvo a temperatura ambiente en condiciones de aerobiosis. Se utilizaron tubos de control que contenían solamente el jarabe. Se trabajó por duplicado.

2.4.3 Viabilidad de las cepas seleccionadas en el alimento artificial (jarabe).

Para estudiar la viabilidad de las cepas seleccionadas en jarabes de sacarosa utilizados habitualmente para alimentar a abejas (*Apis mellifera*) en producción, se utilizó la técnica del recuento en placa (RP).

2.4.4 Recuento en Placa (RP).

Para la preparación de las muestras se tomó de cultivos frescos (incubación 24 h) 0,1 mL y se inoculó en 9,9 mL de Solución Salina Peptonada (SSP) pH 6,5 y mediante dilución seriada se llegó hasta la dilución 10^{-4} . De las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} se transfirió a la superficie de placas Petri que contenían el medio MRS solidificado 0.1 mL el cual fue expandido en la superficie auxiliado por una espátula de Drigalski. La incubación se realizó en condiciones de anaerobiosis por período de 72 h. Se trabajó por duplicado. (Figura 1)

Interpretación.

La presencia de coagulación al invertir el tubo se considerará como reacción positiva. Como cepa testigo se utilizó el *L. acidophilus*. Se trabajó en cada caso por duplicado.

El porcentaje de crecimiento en este método fue calculado mediante la siguiente ecuación: $\% C = \text{Log UFC } N_1 / \text{Log UFC } N_0 \times 100$. Donde N_1 representa el total de células viables después del período de incubación del jarabe y N_0 el número inicial de microorganismos inoculados (Bao *et al.*, 2010).

2.5 Análisis de datos.

Los datos de los indicadores fueron organizados en Tablas y Figuras. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba T para grupos independientes, considerando en todas los casos nivel de significación de 5%.

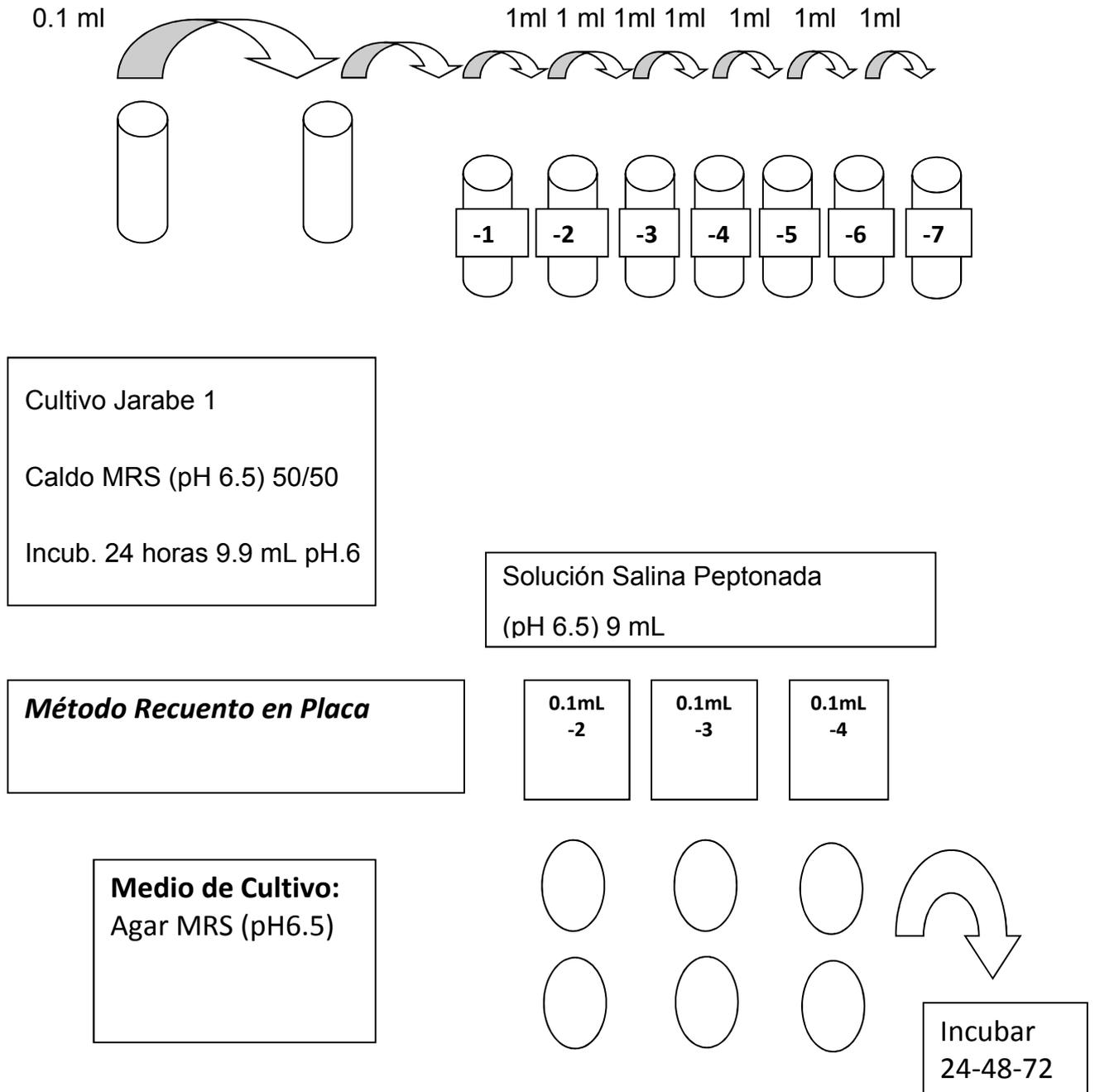


Figura 1. Métodos de siembra microbiológica

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Crecimiento y producción de gas de las BAL en el Medio Base con Sacarosa

En la tabla 1 aparecen los resultados del crecimiento de las diferentes cepas de BAL en el Medio base, pudiéndose observar que excepto *Fructobacillus fructosus* SS66, el resto de las cepas presentan crecimiento débil y abundante (80% de las cepas), con mejor comportamiento *L. rhamnosus* SS73 que llega a formar grumos. Ninguna de las cepas produjo gas.

Tabla 3.1. Crecimiento y producción de gas de las BAL en el Medio Base con Sacarosa (24 h de incubación).

Cepas	Crecimiento (Turbidez)	Producción de gas
<i>Fructobacillus fructosus</i> (66)	+	-
<i>Lactobacillus kunkeei</i> (70)	++	-
<i>Fructobacillus fructosus</i> (72)	+++	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (73)	+++*	-
<i>Lactococcus garvieae</i> (79)	+++	-

Referencias: - Ausencia de crecimiento; + Crecimiento muy débil; ++ Crecimiento débil; +++ Crecimiento abundante. *Formación de grumos.

Una diferencia destacada entre subgrupos de las BAL es la naturaleza de sus productos finales, formados durante la fermentación de los azúcares (Madigan *et al.*, 2004). Las BAL pueden ser consideradas como homo- o heterofermentativas, dependiendo de cómo fermenten los azúcares (hexosas y pentosas) en condiciones de crecimiento. Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Mayerhof- Parnas (EMP), resultando el ácido láctico como el producto final.

Las BAL son muy exigentes en su nutrición al requerir una gran cantidad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas principalmente del grupo B y fuentes de carbono).

La mayor parte de las BAL obtienen energía solo del metabolismo de los azúcares y compuestos relacionados fermentables, por lo cual su desarrollo está restringido a ambientes ricos en azúcares (Leveau y Bouxi, 2000; Madigan *et al.*, 2004)

Moreno (2012), en estudio sobre aislamiento y selección de *Lactobacillus ssp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas encontró, basados en la tabla de identificación del sistema API®50 CHL que *L. kunkeei* era fermentador de glucosa, fructosa y sacarosa, germen que mostró similitud con el *Lactobacillus delbrueckii ssp* quien fermentó los mismos carbohidratos.

3.2 Viabilidad y porcentaje de crecimiento en el *L. rhamnosus* SS73 en jarabes de sacarosa

En el estudio de viabilidad de las cepas seleccionadas en jarabes de sacarosa utilizados habitualmente para alimentar a las abejas en producción (tabla 3.2) se pudo observar que a los 7 días, *Lactobacillus rhamnosus* SS73 en el jarabe 1 mediante la técnica de recuento en placa mostró un incremento del número de microorganismos, con un porcentaje de crecimiento del 104 % (fig. 2). En el jarabe 2, para la técnica nombrada anteriormente se observó un nivel de supervivencia del 110 %. A los 14 días no se apreció viabilidad de la cepa en estudio.

Tabla 3.2. Viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* SS73 en jarabes de sacarosa.

<i>L. rhamnosus</i> (73)						
Tiempos días	Jarabe 1			Jarabe 2		
	N	Media (Log ₁₀ UFC/mL)	DS	N	Media (Log ₁₀ UFC/mL)	DS
T0	6	6,26 ^a	,127	6	6,61 ^a	,058
T7	9	6,51 ^b	,094	9	7,33 ^b	,076

Referencias: J1= jarabe de sacarosa 50% p/v. J2=jarabe de sacarosa 12,5% p/v. Letras desiguales en la misma columna difieren significativamente (P< 0.05) entre sí.

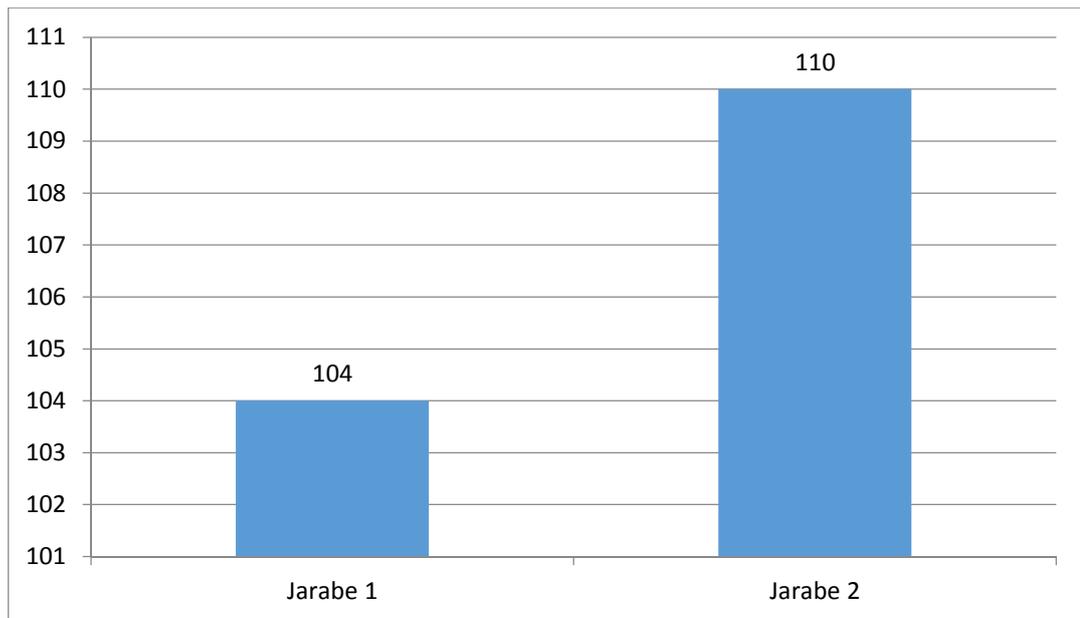


Figura 2. Porcentaje de crecimiento de *L. rhamnosus* SS73 en jarabes de sacarosa.

3.3 Viabilidad y porcentaje de crecimiento en el *L. kunkeei* SS73 en jarabes de sacarosa

Cuando observamos en la tabla 3.4 el resultado de *Lactobacillus kunkeei* SS70 en jarabes de sacarosa, se apreció viabilidad hasta los 21 días en ambos tipos de jarabe, encontrándose diferencias significativas entre los conteos a los diferentes momentos de recuento. No obstante, en el J1 el porcentaje de crecimiento se mantuvo por encima del 70 % hasta los 21 d, mientras que en el J2 descendió drásticamente de los 7d a los 14 d (fig. 3). En todos los caso existió diferencias significativas entre los conteos.

Tabla 3.4. Viabilidad de *Lactobacillus kunkeei* SS70 en jarabes de sacarosa.

<i>L. kunkeei</i> (70)						
Tiempos días	Jarabe 1			Jarabe 2		
	N	Media (Log ₁₀ UFC/mL)	DS	N	Media (Log ₁₀ UFC/mL)	DS
T0	6	6,52 ^a	,055	6	6,63 ^a	,062
T7	6	5,14 ^b	,058	6	7,20 ^b	,106
T14	6	7,30 ^c	,159	3	2,91 ^c	,080
T21	6	5,29 ^d	,137		0	0

Referencias: J1= jarabe de sacarosa 50% p/v. J2=jarabe de sacarosa 12,5% p/v.

Letras desiguales en la misma columna difieren significativamente (P< 0.05) entre sí.

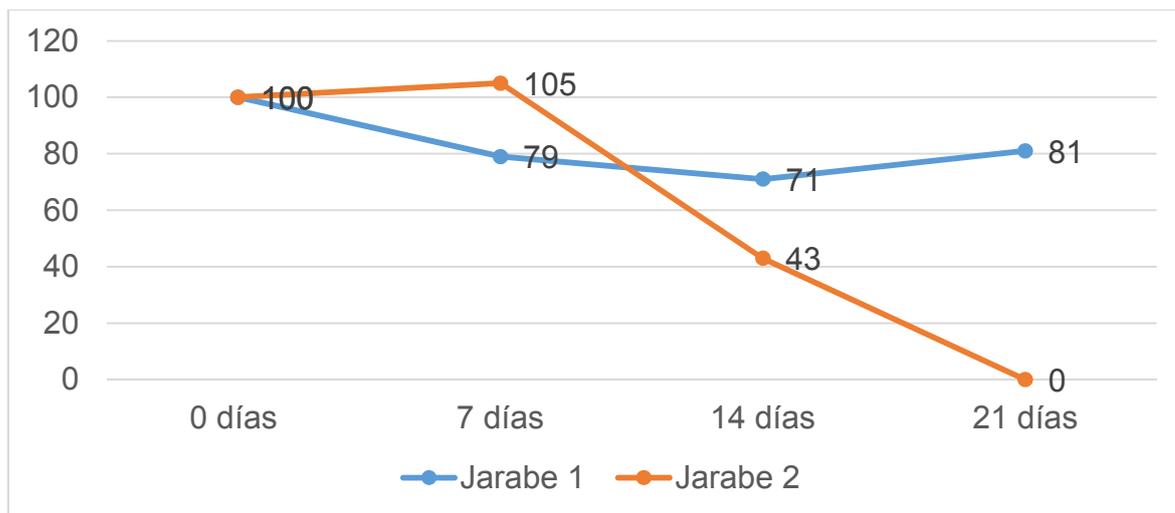


Figura 3. Porcientos de crecimiento de *Lactobacillus kunkeei* SS73 en Jarabe 1 y 2.

El análisis realizado entre los diferentes conteos de ambas cepas (tabla 3.5), se pudo comprobar que no mostraron diferencias significativas, aunque se ve favorecido *Lactobacillus rhamnosus* SS73

Tabla 3.5. Comparación de la viabilidad de *Lactobacillus kunkeei* SS70 vs *Lactobacillus rhamnosus* SS73 en jarabes de sacarosa.

Cepas	N	Media (Log ₁₀ UFC/mL)	DS
<i>L. rhamnosus</i>	15	6,41 ^a	,162
<i>L. kunkeei</i>	24	6,06 ^a	,917

Letras desiguales en la misma columna difieren significativamente ($P < 0.05$) entre sí.

La supervivencia de las abejas melíferas depende del funcionamiento exitoso de sus mecanismos de defensa frente a los diferentes microorganismos patógenos. En la flora bacteriana indígena del intestino predominan las bacterias ácido lácticas quienes juegan un rol importante en la protección de abejas y otros insectos contra la colonización de agentes patógenos y en el control del crecimiento de microorganismos indeseables (Wilson *et al.*, 2005; Audisio *et al.*, 2011).

Ptaszyńska *et al.*, (2016_b) en estudio sobre evaluación de la supervivencia de *L. rhamnosus* (73) en concentración de sirope al 56.56 % (v/v), destinado a la

alimentación de las abejas melíferas, encontró viabilidad de la cepa probiótica pasada las 96 h de incubación a 30 ° C y humedad de 60 %. En nuestro estudio se incubó en condiciones semejantes y se encontró supervivencia de ambas cepas a los 7 d (168 h) de incubación.

Es bien conocido que la sacarosa, en concentraciones altas, induce a stress osmótico en la pared celular, conectada con la pérdida de agua de la membrana y las proteínas, aunque en concentraciones bajas, se convierte en osmoprotectora. (Beney y Gervais 2001; Tymczyszyn *et al.*,2007; Randazzo *et al.*,2013).

El sirope de sacarosa ha sido utilizado como vehículo para hacer llegar bacterias probióticas a las abejas, manejándose concentraciones similares a las utilizadas en el trabajo, refiriéndose concentraciones finales de 1×10^5 cfu/ml (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011), niveles que están por debajo del alcanzado por las cepas *L. kunkeei* SS70 y *L. rhamnosus* SS73 a los 7d de incubación en este estudio.

En los métodos anteriores se determina el número de células totales, pero en muchos casos únicamente interesa contar células viables. Se define como célula viable, aquella célula que es capaz de dividirse y forma una progenie y la manera usual para realizar un recuento de células viables es determinando el número de células en la muestra, capaces de formar colonias sobre un medio de cultivo sólido (agar) y esto se conoce como recuento en placa. (Tortora *et al.*, 2007)

En este procedimiento se realizan diluciones seriadas de la muestra y se inoculan pequeños volúmenes conocidos, de cada una de las diluciones, en placas de Petri conteniendo un medio sólido adecuado estéril y se extiende con una varilla de vidrio (método de siembra en placa por extensión o disseminación) o en placas de Petri estériles a las cuales se les adiciona un medio sólido fundido y enfriado a 45°C y se mezclan bien (método de siembra por incorporación o de vertido en placa), luego se incuban en las condiciones óptimas hasta que aparezcan las colonias correspondientes. Se asume que cada colonia proviene de la división sucesiva de una sola célula, conociendo el volumen sembrado y la dilución de la cual proviene y contando el número de colonias en la placa correspondiente se puede calcular el número de células viables en la muestra. (Tortora *et al.*, 2007)

Debido a que es difícil saber si una sola bacteria dio origen a una colonia, se expresa usualmente el número de células viables como unidades formadoras de colonias (UFC). Para realizar el recuento se seleccionan las placas de la que contengan entre 25 y 250 colonias frecuentemente, y con resultados satisfactorios, para la estimación de las poblaciones bacterianas en la leche, agua, y otros productos. Es fácil de realizar y se adapta a la medición de poblaciones de cualquier densidad. (Prescott *et al.*, 1999)

4. CONCLUSIONES

Se concluye que las BAL crecen en Medio Base Sacarosa (MBS) sin producción de gas.

Lactobacillus kunkeei SS70 y *Lactobacillus rhamnosus* SS73 mantienen viabilidad en los jarabes ensayados hasta los 7 días.

Lactobacillus rhamnosus SS73 mostró mejor % de crecimiento en el Jarabe 2 y *Lactobacillus kunkeei* SS70 en el Jarabe 1.

5. RECOMENDACIONES

Evaluar la viabilidad del *Lactobacillus kunkeei* después de los 21 días en el jarabe

Extender mediante la metodología desarrollada la investigación de otros *Lactobacillus* aislados del intestino de las abejas.

Realizar estudios in vivo para comprobar la palatabilidad del jarabe en la alimentación artificial de las abejas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ACPA. Asociación Cubana de Producción Animal. Finquero. Fincas Diversificadas. Ed. ACPA. Cuba. p. 63-69. 2010.
- AHN, J H; HONG, I P; BOK, J I; KIM, B Y; SONG, J; WEON, H Y
Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honeybees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology* 50(5): 735-45. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-2188-0>. (2012)
- APITRACK. "EE.UU. Las abejas son más numerosas que los mamíferos y los pájaros combinados". Noticias 175. Disponible:
<http://www.thedailygreen.com/environmental-news/latest/bee-census-47061205>. 2008
- Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Ibarguren C, Apella MC Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res* 1:1–13. (2011).
- Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Ibarguren C, Apella MC Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. Bee-gut. *Microbiol Res* 166:1–13. (2011).
- Audisio, M. Carina; Sabaté, Daniela C. Benitez-Ahrendts, Marcelo R. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes*, vol. 2 p. 29 – 29. 2011.
- Audisio, M. Carina; Sabaté, Daniela C; Benitez-Ahrendts, Marcelo R. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes*, vol. 2 p. 29 – 29. 2011.
- Audisio, M.C. and Benítez-Ahrendts, M.R., *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Beneficial Microbes* 2: 29-34. 2011.

- Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol* 59:600–10. 2007.
- Babendreier D, Joller D, Romeis J, Bigler F, Widmer F. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiol Ecol* 59:600–10. 2007.
- Bao, Y; Zhang, Y; Liu, Y; Wang, S; Dong, X; Wang, Y; Zhang, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control* 21(5): 695-701. 2010.
- Barnett, E.A., Charlton, A.J. and Fletcher, M.R. Incidents of bee poisoning with pesticides in the United Kingdom, 1994-2003. *Pest Management Science* 63: 1051-1057. 2007.
- Beney L, Gervais P .Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:34–42. (2001)
- Bottacini F, Milani C, Turrone F, Sánchez B, Foroni E, Duranti S, Serafini F, Viappiani A, Strati F, Ferrarini A, Delledonne M, Henrissat B, Coutinho P, Fitzgerald GF, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M *Bifidobacterium asteroides* PRL2011 genome analysis reveals clues for colonization of the insect gut. *PLoS One* 7(9):e44229. Doi:10.1371/journal.pone.0044229. (2012).
- Bradbear, N. La apicultura y los medios de vida sostenibles. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).Roma, Italia. 2005.
- Bradbear, N. La apicultura y los medios sostenibles. Organización de las naciones unidad pada la agricultura y la alimentación FAO. 2005
- Brizuela María A.; Lourdes Bueno, J. P. Guyot, Nieves García; Quintans.P. Paloma López. Evaluación fisiológica y tecnológica de cepas de *Lactobacillus* con potencialidades probióticas. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*. Vol 25. No- 1.p- 16. 2001.

- Carpana, E. L'Aperegina. Allevamento e Selezione. IL Genere Apis: Evoluzione e Biogeografia. Parte 1. En: Genética. Capítulo 1. Istituto Nazionale di Apicoltura Bologna. Italia. p. 23-89. 2004.
- Chahbar Nora; Mahamed A.L. Contribution to identification of the microflora of the digestive tract and pollen of Algerian honeybees: *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* .3 (6) 601-607. (2014).
- Delgado R. F., De la Caridad Herlinda R., Barreto G., Vázquez R. Efecto probiótico de *Saccharomyces cerevisiae* en parámetros hemáticos y metabólicos de terneros en pastoreo. *Revista. Producción. animal.*, 26 (3): ISSN 2224-7920. (2014).
- Demedio, J. L., Sanabria J. L., Leal, A., Lóriga, W. & Fonte, L. Polinización apícola: una invitación a los agricultores. *Revista CEDAR. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez"*. Cuba (2011).
- Demedio, J. L., Sanabria J. L., Leal, A., Lóriga, W. & Fonte, L. Polinización apícola: una invitación a los agricultores. *Revista CEDAR. Universidad Agraria de La Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez"*. Cuba. (2011).
- Edwards, C.G., K.M. Haag, M.D. Collins, R.A. Hutson and Y.C. Huang. *Lactobacillus kunkeei* sp. Nov. a spoilage organism associated with grape juice fermentations. *J. Appl. Microbiol.* 84:698–702. 1998.
- Edwards, C; Hagg, M; Collins, R; Hutson, R; Huang, Y. *Lactobacillus kunkeei* sp. Nov: spoilage organism associated with grape juice fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 84: 698-702. 1998.
- Engel P, Martinson VG, Moran NA. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honeybee. *Proc Malt Acad Sci USA* 109:11002–11007. (2012).
- Engel, P; James, R; Koga, R; Kwong, W K; McFrederick, Q S; Moran, N. A Standard method for research on *Apis mellifera* gut symbionts. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Ends) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research.* *Journal of Apicultural Research* 52(4): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.07>. (2013)

- Evans J. D., Armstrong T.-N.: Antagonistic interactions between honeybee bacterial symbionts and implication for disease. *BMC Ecology*, 6, 4. 11. 2006.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D.: Immune pathways and defence mechanisms in honeybees *Apis mellifera*. *Insect Mol. Biol.*, 15, 645-656. 2006.
- Evans, J.D. and Schwarz, R.S. Bees brought to their knees: microbes affecting honeybee health. *Trends in Microbiology* 19: 614-620. 2011
- Evans, J.D. Diverse origins of tetracycline resistance in the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 83: 46-50. 2003.
- Fonticiella Ada M. Influencia de la aplicación de microorganismos productores de ácido láctico (*Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus termophilus*) en el Cultivo de postlarvas de Camarón Blanco *Litopenaeus schmitti*. Trabajo presentado para la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista. Sede Universitaria Sancti Spíritus. p32. 2005.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO, Food and Nutrition Pap. 85: 50 pp.
- Fooks, L; Gibson, G. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88 S39-S49. 2002.
- Fries I, Chauzat M-P, Chen Y-P, Doublet V, Genersch E, Gisder S. Standard methods for nosema research. In: Dietemann V, Ellis JD, and Neumann P (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *J Apic Res*. Doi:10.3896/IBRA.1.52.1.14. (2013).
- García C. Yanelys, García Yaneisy, López Anahí y Boucourt R. Probióticos: una alternativa para mejorar el comportamiento animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 39, No. 2. (2005).
- García Yaneisy H., García Yanelys C. Uso de aditivos en la alimentación animal: 50 años de experiencia en el Instituto de Ciencia Animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 49, Número 2. 173. 2015.

- Genersch, E., Forsgren, E., Pentikainen, J., Ashiralieva, A., Rauch, S., Kilwinski, J., Fries, I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 501–511. 2006.
- Gilliam M, Morton HL .Bacteria belonging to the genus *Bacillus* isolated from honeybees, *Apis mellifera*, fed 2, 4-d and antibiotics. *Apidologie* 9:213–222. (1978).
- Gilliam M, Prest D B. Microbiology of the larval honeybee, *Apis mellifera*. *J Invert Pathol*; 49: 70–5. 1987
- Gilliam M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honeybees. *FEMS Microbiol Lett*; 155:1–10. (1997).
- Graaf DC, Alippi AM, Antúnez K, Aronstein KA, Budge G, De Koker D, y col. Standard methods for American foulbrood research. *J Apic Res.*; 52(1). 2013.
- Green, K; Mennickent, S. Los probióticos y su utilidad terapéutica. *Revista Ciencia Ahora* 24:p31-38. 2009.
- Hammes W, Hertel C, Eds. *The Genera Lactobacillus and Carnobacterium*: Springer-Verlag. pp 320–403. (2009).
- Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C. and Martín-Hernández, R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology* 5: 17-29. 2013
- Intriago, P., y D.A. Jones. Bacteria as food for *Artemia*. *Aquaculture* 13. 115-127. 1993.
- Jeyaprakash A., Hoy M.A., Allsopp M.H. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences, *J. Invertebr. Pathol.* 84, 96–103. (2003).
- Kacaniova M, Chlebo R, Kopernický M, Trakovická A Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol* 49:169–171. (2004).
- KWONG, W K; MORAN, N A .Cultivation and characterization of the gutsymbionts of honeybees and bumblebees: *Snodgrassella alvi* gen. Nov., sp. Nov., a member of the Neisseriaceae family of the Betaproteobacteria; and *Gilliamella*

apicola gen. Nov., sp. Nov., a member of Orbaceae fam. Nov., Orbalesord. nov., a sistertaxonto the Enterobacterialesorder of the Gamma proteobacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 2008-2018. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.044875-0> (2013)

KLEEREBEZEM, M; VAUGHAN, E Probiotic and gutlactobacilli and bifidobacteria: molecular approachestostudydiversity and activity. AnnualReview of Microbiology 63: 269-290.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073341>. (2009)

Kremen, C., Williams, N.M., Aizen, M.A., Gemmill-Herren, B., Lebuhn, G. and Minckley, R. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land use change. Ecology Letter 10: 299-314. 2007

Miranda, A., Kruger, MF., De Souza Barbosa, M., Landgraf, M., Destro, MT., Todorov, SD. And De Melo Franco, B DG. Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Rocket salad (*Eruca sativa* Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. Food control, 33(2), p. 467-476. 2013.

Lavine MD, Strand. M.R .Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem Mol Biol 32:1295–1309. (2002).

Ley 165 para el Convenio de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica (ONU 1994).

Leveau, J.Y., Bouix, M. Microbiologia industrial: Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia. Zaragoza, España, pag. 167- 168, 206,227-242. (2000).

M.C. Audisio¹, 2*, D.C. Sabaté¹ and M.R. Benítez-Ahrendts³. Effect of *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 on different parameters of honeybee colonies and bacterial populations of the bee gut. Beneficial Microbes, 2015; ISSN 1876-2833 print, ISSN 1876-2891 online, DOI 10.3920/BM2014.0155. (2015).

Rada V, Máchová M, Huk J, Smékal F. Development of probiotics for bees. Apiacta 4:99–111. (1997)

- Madigan, M.T., Martinke, J.M., Parker, J.B. *Biología de los microorganismos* 10 ed. Prentice Hall. Madrid, España .pp.121, 352,400-402,991. 2004.
- Marín, A. Efecto probiótico del BIOPRANAL sobre los indicadores bioproductivos y de salud en terneros. *Revista Virtual Amazónica*.
<http://www.uea.edu.ec/revista/articulos/R1N12010Art5.pdf>. 2010.
- Martel AC, Zeggane S, Drajnudel P, Faucon JP, Aubert M Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit Contam* 23:265–273. (2006).
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O., Tingek, S. and Moran, N.A., 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*
- Martinson V.G, Danforth BN, Minckley RL, Rueppell O, Tingek S, Moran N.A .A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol Ecol* 20:285–295. (2011).
- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley, R.L., Rueppell, O. Tingek, S. and Moran, N.A. A simple and distinctive microbiota associated with honeybees and bumblebees. *Molecular Ecology*. 2011
- Maurizio A. The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological conditions of the honeybee. *Bee World*. ; 31(2):9–12. 1950.
- McFrederick QS, Wcislo WT, Taylor DR, Ishak HD, Dowd SE, Mueller UG. Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol Ecol* 21:1754–1768. (2012).
- Milián Grethel, Rondón A.J., Pérez M., Bocourt R., Rodríguez Z., Ranilla M.J. Rodríguez M. 1 y Carro M.D. Evaluación de biopreparados de *Bacillus subtilis* como promotores del crecimiento en pollos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 47, Número 1, 61. (2013).
- MINAG, Resolución 547/2013.
- Miyagi, T., Peng, C.Y.S., Chuang, R.Y., Mussen, E.C., Spivak, M.S. and Doi, R.H. Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 95-96. 2000.

- Mohr KI, Tebbe. C.C. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Env Microbiol* 8:258–272. (2006)
- Morán, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E. and Sabree, Z.L. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE* 7: 1-10. 2012.
- Moreno Galarza, Lizeth Johanna. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias-Microbiología. Directora: M.Sc. Judith Figueroa Ramírez. Universidad Nacional de Colombia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/8647/1/lizethjohannamorenogalarza..pdf>. Consultada 2 de mayo 2017. (2012)
- Morse, R.A., Calderone, N.W. The value of honeybee pollination in the United States *Bee Culture* 128, 1–15. 2000.
- Natalichio, R. La biodiversidad del planeta, en juego. ECOPORTAL. Disponible en: www.ecoport.net. Consultado [05/23/2008]. 2008.
- Nava GM, Davila V. Nuevas perspectivas en la selección y evaluación de probióticos. *Revista Chilena de nutrición*. Vol. 21, Suplemento N° 1, Noviembre. p-184-185. (2004).
- Neveling, D, P, Endo, A, Dickg, L.M .Fructophilic *Lactobacillus kunkeei* and *Lactobacillus brevis* isolated from fresh flowers, bees and bee- kives. *Curr. Microbiol*, 65, 507-515. (2012).
- Noticias Api News. Utilizando a las abejas como indicador del estado del medio ambiente. España. Disponible: <http://www.apinews.com/es/component/k2/item/23042>. (2013).
- Olofsson TC, Vásquez A .Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol* 57:356–363. (2008).
- Olofsson TC, Vásquez A. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol*; 57:356–63. 2008.

- Ouwehand AC, Salminen S. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J*; 8: 749-758. 1998.
- Padilla F. A., Flores Serrano J. M. y Campano F. C. La defensa de las abejas frente a la enfermedad. *El Colmenar*. nº 95 julio-septiembre. (2009).
- Pătruică S, Mot D the effect of using prebiotic and probiotic products on intestinal Microflora of the honeybee (*Apis mellifera carpatica*). *Bull Entomol Res* 102:619–623. (2012)
- Pesante, D. Anatomía de la abeja (en línea). Consultado 10 ene. 2012. Disponible en <http://academic.uprm.edu/dpesante/4016/03-anato.PDF> Organización mundial de gastroenterología. 2008. Probióticos y prebióticos (en línea). Consultado 18 nov. 2011. Disponible en http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/es/pdf/guidelines/19_probioticos_prebioticos_pdf. 2010
- Prescott, L.; Harley, J.; Klein D. Microbiología. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana. 1999.
- Ptaszyńska A. A., Borsuk G., Mułenko W., Wilk. Impact of vertebrate probiotics on honeybee yeast microbiota and on the course of noseosis. *Med. Weter.* 2016_a, 72 (7), 430-434. 2016. a
- Ptaszyńska, A.A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A. Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee noseosis. (2016_b).
- Randazzo CL, Pitino I, Licciardello F, Muratore G, Caggia C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. *Food Sci Technol (Campinas)* 33:652–659. (2013).
- Rodríguez González, M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Departamento de Genética y de Microbiología. (2009).
- Rodríguez J.C., Carmenate María del Carmen, Hernández J.E., Guerra A., Calero I., Álvarez J.M., Martín E. y Suárez Madeleine .Evaluación del suministro de un preparado biológico de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus*

- termophilus en cerdos en crecimiento. Revista Computadorizada de Producción Porcina. Volumen 16 (número 1). 54-58. (2009).
- Rodríguez, D; Rocha, T, Gómez, A; Goodfellow, B; Freitas, A. Lipolysis in probiotic and symbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. Food Chemistry 131: 1414-1421. 2012.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Laurencio, M. & Pérez, M. Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus* spp. strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers. Revista Ciencia. Tecnología. Alimentación. 6(1):56-63. 2008.
- Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology 103: S96-S119. 2010.
- Rousseau M, Tysset C, Durand C. Presence of streptococci of the Lancefield D group in healthy working bees (*Apis mellifera* L.). Interpretation of their presence in alimentary bacteriology. Bull Acad Vet Fr; 42:173-86. 1969.
- Sánchez Lilian, Tromps Jeannette. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. Rev. Salud Anim. Vol. 36 No. 2: 124-129. (2014).
- Sánchez, L., Vichi, J., Llanes, M., Castro, E., Soler, D. M., Espinosa, I., & Ferreira, C. Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus* spp como candidato a probióticas. Revista de Salud Animal, 33(3), 154-160. (2011).
- Sanidad apícola, colectivo de autores, 2002.
- Scardovi V., Trovatielli L.D. New species of bifid bacteria from *Apis mellifera* L. And *Apis indica* F.A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*, Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 123, 64-88. (1969).
- Tajabadi N, Mardan M, Manap MYA, Shuhaim M, Meimandipour A, Nateghi L .Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. Apidologie 42:642-649CrossRefGoogle Scholar. (2011)

- Tajabadi, N., Mardan, M., Saari, N., Mustafa, S., Bahreini, R and Manap, M.Y.A., Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 717-722. 2013.
- Tian, B.Y., Fadhil, N.H., Powell, J.E., Kwong, W.K., Moran, N.A. Long-term exposure to antibiotics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. *Microbiology* 3(6), e00377–00312 Google Scholar. (2012)
- Torres MJ, Petroselli G, Daz M, Erra-Balsells R, Audisio MC *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against Gram-positive foodborne pathogenic bacteria. UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds. *World J Microbiol Biotechnol* 31:929–940. (2015).
- Tortora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case. *Introducción a la Microbiología* 9na Edición. Editorial Médica Panamericana. 2007.
- Tymcyszyn EE, Gómez-Zavaglia A, Disalvo EA Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Appl Microbiol* 102:845–851. (2007).
- Vásquez A, Forsgren E, Fries I, Paxton RJ, Flaberg E, Szekely L, Olofsson. T.C .Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. *PLoS* 1 7:e33188. (2012).
- Verde Mayda M. Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 48, Número 1, 2014. 25. (2014).
- Verde Mayda M. Apicultura y seguridad alimentaria. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 48, Número 1, 2014. 25. (2014).
- Verde Mayda, Chan V. S. Estrategia de lucha integrada para el control de varroa: Resultados y experiencia cubana. Octubre/2005 – Consultada Mayo 2015 .*Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* .ISSN 1695-750. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>. Vol. VI, Nº 10. 2005.
- Verde, M. Curso de actualización de apicultura. Conferencia técnica. Consejo Científico Veterinario de Cuba. Digital. 2010.

- Verde, M. y col. Polinización y polinizadores. Guión para la televisión cubana. Programa "De sol a sol". Empresa comercializadora CAGUAX. Ministerio de la Agricultura. Cuba. 2013.
- Verde, M., Gómez, T. & Demedio, J. Salud apícola. Tomo I. Generalidades. Ed. Consejo Científico Veterinario. p. 57-73. 2012.
- Wilson-Rich N., S. T. Dres, P. T. Starks. The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* 54: 1392-1399. (2008)
- Yangari, B. El ocaso de las abejas alarma a los científicos. Ed. CENSA. Red de Desastres: redesastres@censa.edu.cu Cuba. Circulado por: Abeledo, G. <abeledo@censa.edu.cu> Infomed. Cuba. Fecha: 13 de mayo, 14:59:15 - 0500. 2008.

7. ANEXOS.

